

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ LRR-ПОВТОРЫ, И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ГЕТЕРОТРИМЕРНЫМИ G-БЕЛКАМИ

© А. О. Шпаков

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: alex\_shpakov@list.ru

Обобщены и проанализированы данные о структурно-функциональной организации рецепторов серпантинного типа, содержащих LRR-повторы и называемых LGR-рецепторами, к которым относятся рецепторы гипофизарных гликопротеиновых гормонов (гонадотропинов и тиреотропина) и релаксиновые рецепторы RXFP1 и RXFP2. Рассмотрены механизмы активации этих рецепторов гормонами, а также молекулярные основы их взаимодействия с гетеротримерными G-белками. Обсуждается роль проксимальных к мембране участков цитоплазматических петель рецепторов и соседних с ними сегментов трансмембранных участков в формировании G-белоксвязывающей поверхности рецептора и активации G-белков. На основе данных литературы и результатов собственных исследований в LGR-рецепторах идентифицированы молекулярные детерминанты, ответственные за селективность и эффективность взаимодействия с G-белками.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АКО — аминокислотный остаток, ВП — внеклеточная петля, ЛГ — лютеинизирующий гормон, СКД — С-концевой домен рецептора, ТМ — трансмембранный участок, ТТГ — тиреотропный гормон, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, ЦП — цитоплазматическая петля, LGR-рецептор — leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor, LRR-повторы — leucine-rich repeats, G-белок — гетеротримерный ГТФ-связывающий белок.

Ключевые слова: аденилатциклаза, гетеротримерный G-белок, лютеинизирующий гормон, релаксин, тиреотропный гормон, фолликулостимулирующий гормон, фосфоинозитиды, цитоплазматическая петля, LGR-рецептор.

Среди рецепторов серпантинного типа, сопряженных с гетеротримерными G-белками, выделяется группа LGR-рецепторов (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor), характерной особенностью которых является наличие в значительном по размеру внеклеточном домене (эктодоме) повторяющихся последовательностей — LRR-повторов (leucine-rich repeats), которые обогащены остатками лейцина и формируют  $\alpha$ -спиральные структуры (Oh et al., 2006). LGR-рецепторы относят к трем типам — А, В и С, которые различаются по структуре и организации LRR-повторов (Hsu et al., 2003). Филогенетический анализ LGR-рецепторов показал, что они являются эволюционно древними и сформировались как три отдельных типа еще на уровне беспозвоночных животных (Hsu et al., 2000).

Тип А включает в себя рецепторы гипофизарных гликопротеиновых гормонов — фолликулостимулирующего (ФСГ) (Dias et al., 2002), лютеинизирующего (ЛГ) (Ascoli et al., 2002) и тиреотропного (ТТГ) (Szkudlinski et al., 2002). К типу В относят орфановые рецепторы LGR4, LGR5 и LGR6, функции которых в настоящее время мало изучены (Hsu et al., 2000; Vassart et al., 2004). Тип С включает в себя рецептор релаксина RXFP1 (RelaXin Family Peptide Receptor 1), обозначаемый также LGR7 (Hsu et al., 2000, 2002), и родственный ему рецептор RXFP2 (LGR8),

который связывается с инсулиноподобным фактором 3 более эффективно, чем с релаксином (Kumagai et al., 2002). У мухи *Drosophila melanogaster* обнаружен гомолог LGR-рецепторов млекопитающих, который специфически связывается с бурсиконом — гормоном, регулирующим образование кутикулы (Luo et al., 2005; Mendive et al., 2005). У моллюска *Lymnaea stagnalis* также есть LGR-рецептор (GRL101), который имеет значительный по размеру внеклеточный N-концевой домен, содержащий LRR-повторы, и С-концевой домен, представляющий собой рецептор серпантинного типа (Tensen et al., 1994). Рецептор GRL101 обнаруживается в основном в нервных клетках и, как полагают, играет важную роль в передаче сигналов, генерируемых липопротеидами, в нервной системе моллюска.

Интерес к LGR-рецепторам обусловлен тем, что они являются ключевым звеном в регулируемых гипофизарными гликопротеиновыми гормонами и релаксином сигнальных каскадах, через которые осуществляется контроль за функционированием репродуктивной, сердечно-сосудистой, мочевыделительной и ряда других жизненно важных систем организма. Изменение связывающих характеристик LGR-рецепторов и нарушение их сопряжения с гетеротримерными G-белками приводят к развитию широкого спектра социально значимых эндо-

кринных и онкологических заболеваний (Costagliola et al., 2005; Davies et al., 2005; Bathgate et al., 2006).

Настоящий обзор посвящен структурно-функциональной организации LGR-рецепторов млекопитающих и молекулярным механизмам взаимодействия этих рецепторов с гетеротримерными G-белками.

### Структурно-функциональная организация LGR-рецепторов и модели их активации

Специфическое связывание гормона со значительным по размеру внеклеточным доменом (эктодоменом) LGR-рецепторов вызывает в нем конформационные изменения, следствием которых является активация родопсинподобного серпантинного домена (энтодомена), включающего в себя семь трансмембранных участков (TM1—TM7), три внеклеточные петли (ВП-1—ВП-3), три цитоплазматические петли (ЦП-1—ЦП-3) и локализованный в цитоплазме С-концевой домен (СКД) (рис. 1). От активированного серпантинного домена сигнал передается к гетеротримерному G-белку, который сопряжен с эффекторными белками, определяющими ответ клетки на действие гормона.

Все рецепторы гликопротеиновых гормонов и релаксиновые рецепторы RXFP1 и RXFP2 функционально сопряжены с  $G_s$ -белками, через посредство которых они стимулируют активность аденилатциклазы (АЦ) и цАМФ-зависимых сигнальных каскадов (Kumagai et al., 2002; Nguyen et al., 2003; Halls et al., 2006). Однако наряду с  $G_s$ -белками LGR-рецепторы способны стимулировать и

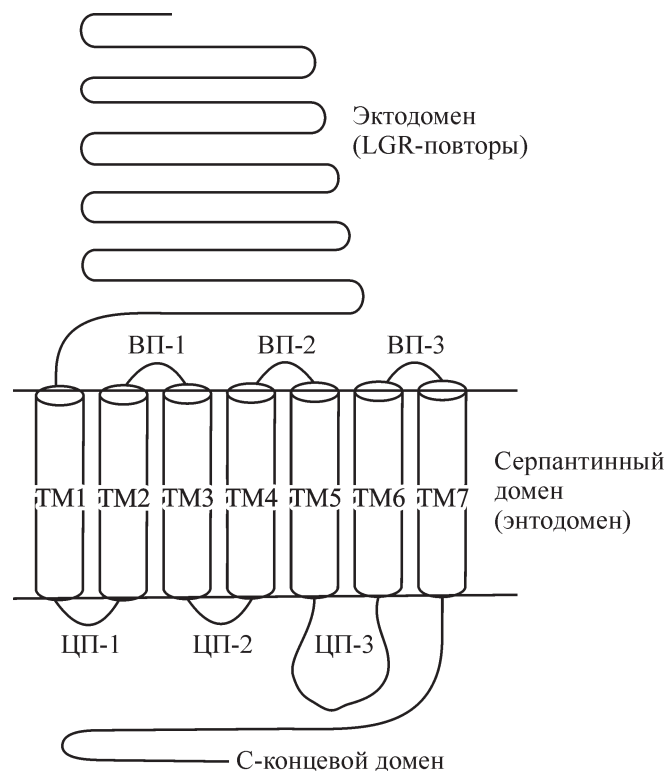


Рис. 1. Строение LGR-рецепторов.

ВП-1, ВП-2 и ВП-3 — первая, вторая и третья внеклеточные петли соответственно; TM1—TM7 — трансмембранные участки; ЦП-1, ЦП-2 и ЦП-3 — первая, вторая и третья цитоплазматические петли соответственно.

другие классы G-белков. Так, рецептор ТТГ взаимодействует с  $G_q$ -,  $G_{i/o}$ - и  $G_{12/13}$ -белками, хотя молекулярные механизмы такого взаимодействия изучены недостаточно (Laugwitz et al., 1996; Buch et al., 2008). Через посредство  $G_q$ -белков ТТГ стимулирует активность фосфолипазы С, которая контролирует фосфоинозитидный обмен и внутриклеточную концентрацию катионов кальция, что лежит в основе регуляции биосинтеза тиреоидных гормонов в щитовидной железе. Через посредство активации  $G_{i/o}$ -белков осуществляется снижение вызываемой ТТГ стимуляции АЦ, а через посредство активации  $G_{13}$ -белков регулируется функциональная активность каскада митогенактивируемых протеинкиназ (Buch et al., 2008). Обнаружено также, что  $\beta\gamma$ -димер, образующийся вследствие диссоциации G-белков в ответ на вызываемую гормоном активацию рецептора ТТГ, стимулирует активность фосфатидилинозитол-3-киназы и экспрессию зависимых от нее генов, причем источником  $\beta\gamma$ -димера могут быть как  $G_s$ -, так и  $G_{i/o}$ -белки (Zaballos et al., 2008). Рецептор ЛГ, так же как и рецептор ТТГ, сопряжен с представителями всех четырех классов G-белков. Связывание с ним хорионического гонадотропина, гомолога ЛГ, вызывает стимуляцию не только  $G_s$ -белков, играющих ключевую роль в реализации регуляторных эффектов ЛГ, но также  $G_q$ -,  $G_{i/o}$ - и  $G_{12/13}$ -белков, функции которых в передаче генерируемого гонадотропинами сигнала пока не установлены (Rajagopalan-Gupta et al., 1998, 1999). Релаксиновые рецепторы RXFP1 и RXFP2 наряду с  $G_s$ -белками активируют  $G_{i/o}$ -белки, что ведет к снижению стимулирующего эффекта релаксина на активность АЦ. В случае рецептора RXFP1  $\beta\gamma$ -димер, высвобождаемый из  $G_{13}$ -белка, вызывает стимуляцию фосфатидилинозитол-3-киназы, активацию и транслокацию протеинкиназы С $\zeta$  к клеточной мембране, что в конечном итоге ведет к стимуляции активности АЦ (Nguyen et al., 2003; Kawamura et al., 2004; Nguyen, Dessauer, 2005; Shpakov et al., 2005; Halls et al., 2006, 2007; Pertseva et al., 2006).

В настоящее время рассматриваются различные модели активации LGR-рецепторов гормонами. Для рецепторов гонадотропинов (ЛГ и ФСГ) предлагаются две модели (Van Koppen et al., 2008). В соответствии с первой из них, в отсутствие гормона эктодомен ассоциирован с петлей ВП-2, которая соединяет TM4 и TM5, вследствие чего серпантинный домен находится в неактивном состоянии. После связывания рецептора с  $\beta$ -субъединицей ЛГ (или ФСГ) ВП-2 высвобождается из комплекса с эктодоменом, что ведет к изменению конформации серпантинного домена и вызывает активацию им гетеротримерного G-белка (Nishi et al., 2000; Karges et al., 2005). В соответствии со второй моделью, в процессе связывания с  $\beta$ -субъединицей гонадотропина в эктодомене происходят конформационные изменения, которые распространяются на серпантинный домен, вызывают его активацию и как следствие — стимуляцию сопряженных с ним G-белков (Yi et al., 2002).

Для рецептора ТТГ общепринятой является модель двух состояний, которая сходна с первой моделью гормональной активации рецепторов гонадотропинов (Szkudlinski et al., 2002; Vlaeminck et al., 2002). В соответствии с ней рецепторы могут существовать в двух конформациях — неактивной («закрытой») и конституционно активной («открытой»), между которыми устанавливается динамическое равновесие. Рецепторы, находящиеся в «открытой» конформации, взаимодействуют с  $G_s$ -белком в отсутствие гормона, что определяет их базальную актив-

ность. Гормон с высокой аффинностью связывается с рецептором в «открытой» конформации, стабилизирует ее и сдвигает равновесие в сторону этой, конституционно активной, формы рецептора. Фактически гормон снимает ингибирующее влияние эктодомена на серпантинный домен рецептора ТТГ. В пользу такой модели свидетельствует и то, что удаление эктодомена в несколько раз повышает конституционную активность рецептора ТТГ (Zhang et al., 2000). При этом рецептор, лишенный эктодомена, в 4—6 раз более эффективно повышает уровень цАМФ и в 4—10 раз — уровень фосфоинозитидов (по сравнению с природной его формой). Таким образом, отсутствие эктодомена не влияет на сопряжение рецептора ТТГ как с G<sub>s</sub>-белками, через которые осуществляется стимуляция активности АЦ, катализирующей образование цАМФ, так и с G<sub>q</sub>-белками, которые сопряжены с фосфолипазой С, ответственной за продукцию фосфоинозитидов. Другая модель активации рецептора ТТГ включает в себя не только снятие ингибирующего влияния эктодомена, но и взаимодействие ассоциированного с гормоном эктодомена с активирующими сайтами, которые включают в себя аминокислотные остатки (АКО), локализованные во всех трех ВП рецептора, в первую очередь в ВП-2, а также на границе эктодомена и серпантинного домена, непосредственно перед ТМ1 (Szkudlinski et al., 2002; Neumann et al., 2005a; Kleinau et al., 2007, 2008).

Для рецепторов RXFP1 и RXFP2 предложена модель, в соответствии с которой гормон связывается с двумя сайтами рецептора, один из которых, высокоаффинный, локализован в эктодомене, в то время как другой, низкоаффинный, формируется ВП-2 серпантинного домена (Sudo et al., 2003; Halls et al., 2005). Исследование мутантных и укороченных форм рецепторов показало, что взаимодействие между этими сайтами необходимо для эффективного связывания гормона и запуска им сигнальных каскадов (Halls et al., 2005). Связывание релаксина с эктодоменом RXFP1 осуществляется вследствие ионного взаимодействия между двумя положительно заряженными остатками Arg-13 и Arg-17, расположенными в В-цепи релаксина, и отрицательно заряженными АКО, локализованными в LRR-повторах, а также гидрофобного взаимодействия между остатком изолейцина (Ile-20) молекулы релаксина и кластером гидрофобных АКО (триптофана, изолейцина и лейцина) в LRR-повторах эктодомена рецептора (Bullesbach, Schwabe, 2005). Связывание инсулин-подобного пептида 3 с RXFP2 также осуществляется с участием как положительно заряженных АКО — His-12, Arg-16 и Arg-20, локализованных в В-цепи гормона, — так и ряда гидрофобных АКО, в первую очередь Trp-27 (Rosengren et al., 2006).

Приведенные выше механизмы активации LGR-рецепторов отличаются от таковых, лежащих в основе активации большинства других рецепторов серпантинного типа, низкомолекулярными гормонами и гормоноподобными веществами (ретиалем, биогенными аминами, олигопептидами и др.). В случае активации этих рецепторов гормон связывается с лигандсвязывающим сайтом, который расположен внутри трансмембранного канала, образуемого семью ТМ. Еще сравнительно недавно считали, что активация серпантинного домена рецепторов гликопротеиновых гормонов низкомолекулярными лигандами невозможна. Однако работы последних лет убедительно доказали, что существует множество различных по химической структуре низкомолекулярных агонистов и антагонистов рецепторов гонадотропинов и ТТГ, которые,

минуя эктодомен, проникают в трансмембранный канал LGR-рецепторов и осуществляют регуляцию их функциональной активности (Moore et al., 2006; Heitman, Ijzerman, 2008). Эти низкомолекулярные регуляторы близки по эффективности своего действия гипофизарным гликопротеиновым гормонам, но в отличие от них более доступны и могут быть применены перорально, что делает их перспективными лекарственными препаратами для лечения заболеваний, связанных с нарушениями в функционировании гипоталамо-гипофизарно-гонадальной и гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной осей.

В активном состоянии рецептор ТТГ образует гомодимерный комплекс, стабилизированный дисульфидными связями между эктодоменами (Kaczur et al., 2003). Имеются данные о формировании олигомерных комплексов, включающих в себя более двух молекул рецептора. Нарушение формирования димерных и (или) олигомерных комплексов ведет к потере рецептором способности отвечать на ТТГ и вызывает значительное повышение его базальной активности, результатом чего является независимая от гормонального воздействия активация сопряженных с рецептором сигнальных каскадов. В составе серпантинного домена в стабилизацию димерного комплекса вовлечены внешние поверхности ТМ5 и ТМ6 и в меньшей степени ТМ1 и ТМ7, в то время как ТМ2, ТМ3 и ТМ4 более важны для образования олигомерных комплексов. ТМ6 включает в себя сегмент 629—633, который формирует полтора оборота  $\alpha$ -спирали в середине ТМ6 и, как полагают, играет ключевую роль в стабилизации комплекса, включающего в себя две молекулы рецептора ТТГ (Farid, Szkudlinski, 2004). Замены каждого из пяти АКО в этом сегменте приводят к конституционно активной форме рецептора (Farid et al., 2000). Остатки Thr-632 и Asp-633 являются частью высококонсервативного в сопряженных с G-белками рецепторах FTD-мотива, взаимодействующего с остатком Asn-674, который включен в NPXXY-мотив, локализованный на цитоплазматическом конце ТМ7. Замена остатка Asn-674 на другие АКО нарушает это взаимодействие и дестабилизирует конформацию трансмембранного канала рецептора (Claeysen et al., 2002; Vassart et al., 2004). Для стабилизации ТМ и формирования трансмембранного канала в рецепторе ТТГ также важны остатки 425—427 в ТМ1 и остатки 540, 543 и 547, локализованные в ТМ4 вблизи высококонсервативного во всех рецепторах серпантинного типа остатка Trp-546 (Kaczur et al., 2003; Knudsen, Farud, 2004).

Предполагается, что рецепторы гонадотропинов (с учетом высокой степени гомологии их ТМ в сравнении с таковыми рецептора ТТГ) также образуют димерные и (или) олигомерные комплексы, однако экспериментальных доказательств в поддержку этого пока не получено. В пользу такого предположения свидетельствует и тот факт, что архитектура и молекулярные механизмы стабилизации трансмембранного канала в рецепторах гонадотропинов и ТТГ имеют черты сходства (Zhang et al., 2005; Puett et al., 2007).

### Молекулярные детерминанты, определяющие взаимодействие LGR-рецепторов с гетеротримерными G-белками

Первая цитоплазматическая петля. ЦП-1 в рецепторах гонадотропинов влияет на процессы их фосфорилирования и интернализации, но непосредственно во

взаимодействии с гетеротримерными G-белками не участвует (Ulloa-Aguirre et al., 2007). Замена остатков серина и треонина в ЦП-1 рецептора ФСГ не влияют на стимуляцию гормоном активности АЦ, которая осуществляется через посредство  $G_s$ -белка, но при этом полностью блокируют вызываемое ФСГ фосфорилирование рецептора цАМФ-независимой протеинкиназой и нарушают его взаимодействие с аррестином-3, что ведет к интернализации рецепторной молекулы (Nakamura et al., 1998a, 1998b; Krishnamurthy et al., 2003). Точечные мутации в ЦП-1 рецептора ФСГ приводят к потере рецептором функциональной активности или переводят его в конституционно активную форму, в которой он имеет высокую базальную активность и не чувствителен к действию гормона (Nakamura et al., 1998a; Nechamen, Dias, 2003; Ulloa-Aguirre et al., 2004). Так, рецептор ФСГ крысы с тройной мутацией в ЦП-1 (T369I/S371I/T376N) находится в конституционно активной форме, а замена в нем остатка Thr-370 блокирует экспрессию мутантного рецептора в клетке (Nakamura et al., 1998a). Это, вероятно, связано с нарушением пространственной структуры трансмембранного канала рецептора с мутациями в ЦП-1, следствием чего являются неспособность такого рецептора нормально встраиваться в плазматическую мембрану и разобщение эктодомена и серпантинного домена, что препятствует передаче гормонального сигнала.

В отношении рецептора ТТГ получены данные о том, что ЦП-1 (441—450) либо непосредственно вовлечена во взаимодействие с  $G_q$ -белком, либо влияет на взаимодействие с ним других цитоплазматических участков рецептора (Kosugi, Mori, 1994a). Замена основной части ЦП-1, TSHYKL(441—446), в рецепторе ТТГ на соответствующие по локализации участки  $\alpha_1$ - и  $\beta_2$ -адренергических рецепторов приводит к мутантным рецепторам, которые не способны активировать  $G_q$ -белок и стимулировать фосфоинозитидный обмен. При этом у мутантных рецепторов сохраняется способность активировать  $G_s$ -белок и стимулировать цАМФ-зависимые сигнальные каскады. К такому же результату приводит и замена высококонсервативного во многих рецепторах серпантинного типа остатка Thr-447 на аланин или глутамин, с той лишь разницей, что рецептор ТТГ с заменой T447Q не способен активировать не только  $G_q$ , но и  $G_s$ -белок. Последнее, вероятно, связано с тем, что мутация T447Q искажает пространственную структуру трансмембранного канала, что ведет к нарушению экспрессии мутантного рецептора в клетке. Таким образом, ЦП-1 в рецепторе ТТГ в отличие от ЦП-1 в рецепторах гонадотропинов вносит свой вклад во взаимодействие с гетеротримерными G-белками, формируя  $G_q$ -связывающую поверхность рецептора.

Вторая цитоплазматическая петля. Полученные в настоящее время данные свидетельствуют о том, что ЦП-2 в рецепторах гонадотропинов и ТТГ ответственна за их переход в активированное состояние вследствие связывания с гормоном и непосредственно участвует в формировании G-белоксвязывающей поверхности (Kosugi et al., 1994; Dhanawada et al., 1996; Fernandez, Puett, 1997; Schulz et al., 1999; Timossi et al., 2002; Neumann et al., 2005b). В отношении роли ЦП-2 в функционировании рецепторов LGR7 и LGR8 сведения отсутствуют. Степень гомологии при сравнении ЦП-2 рецепторов ЛГ, ФСГ и ТТГ, имеющих консенсусную последовательность ERW(T/A)XITXA(M/I)XLDXKX(R/Q)LRH, с таковыми ЦП-2 релаксиновых рецепторов очень низка (рис. 2). Это не позволяет, базируясь на результатах ис-

следований ЦП-2 рецепторов гонадотропинов и ТТГ, высказать какие-то предположения относительно функций этой петли в рецепторах LGR7 и LGR8, в частности в отношении участия ее во взаимодействии с G-белками.

Замены ряда АКО в ЦП-2 рецептора ФСГ ведут к снижению стимулирующего влияния ФСГ на уровень цАМФ в клетке. Среди таких АКО находятся остаток Arg-450, включенный в высококонсервативный N-концевой DRY-мотив (в рецепторах ФСГ, ЛГ и ТТГ он видоизменен в ERW-мотив), остаток Thr-453, мишень для фосфорилирования протеинкиназами, и остаток Leu-460, локализованный в середине ЦП-2 и высококонсервативный в рецепторах гонадотропинов и ТТГ. Ингибирующее влияние мутаций в ЦП-2 на функциональную активность рецептора зависит от природы аминокислотных замен. Замена положительно заряженного остатка Arg-450 на аланин или лизин ведут к снижению на 40—50 % максимального стимулирующего действия ФСГ на АЦ, в то время как замена остатка Arg-450 на гистидин, а также тройная замена R450A/T453A/L460A в этом отношении малоэффективны. Обнаружено также, что замены остатка Leu-460 (L460D, L460P и L460A) в большей степени влияют на базальную активность рецептора, а не на его способность стимулировать АЦ, что, возможно, указывает на участие бокового гидрофобного радикала лейцина в стабилизации активной конформации рецептора (Timossi et al., 2002).

Мутации в сходных позициях ЦП-2 рецептора ЛГ также ведут к снижению стимулирующего эффекта гормона на активность АЦ и влияют на базальную активность рецептора (Dhanawada et al., 1996; Fernandez, Puett, 1997; Schultz et al., 1999). Изучение мутантных рецепторов ЛГ с заменами локализованных в ЦП-2 АКО на аланин показало, что критическими для взаимодействия с  $G_s$ -белками являются остатки Ile-460, Thr-461, Glu-463, Arg-464, His-466, Thr-467, Ile-468, Tyr-470, Ile-472 и Ile-478 (Puett et al., 2007; Angelova et al., 2008). Наиболее важными для активации  $G_s$ -белка являются интерфейс TM3/ЦП-2 и N-концевой участок ЦП-2. При этом остатки Ile-460, Thr-461 и His-466 в большей степени ответственны за переход рецептора в конформацию, обеспечивающую эффективное взаимодействие с  $G_s$ -белком, в то время как остатки Arg-464 (включен в ERW-мотив), Thr-467, Ile-468 и Tyr-470 формируют G-белоксвязывающую поверхность рецептора. Показано, что мутантные рецепторы R464A и I468A имеют соответственно в 8.0 и 3.5 раза более высокие значения  $EC_{50}$  (по сравнению с природной формой рецептора) для стимулирующего действия гормона на АЦ, а максимальное стимулирующее действие ЛГ на АЦ в этом случае снижено в 20 раз и более.

Еще в 1994 г. было обнаружено, что замены участков FAM(525—527) и RLDRK(528—532) в середине ЦП-2 рецептора ТТГ на соответствующие им по локализации участки  $\beta_2$ -адренергического рецептора вызывают нарушение сопряжения мутантных рецепторов с G-белками (Kosugi et al., 1994). Было установлено, что при замене участка 525—527 полностью блокируется способность рецептора взаимодействовать с  $G_s$ -белком и сильно снижается активация им  $G_q$ -белка, в то время как при замене участка 528—532 в большей степени нарушается активация  $G_q$ -сопряженных сигнальных путей. В дальнейшем с помощью техники сайтнаправленного мутагенеза было показано, что остаток Met-527 и в меньшей степени остатки Phe-525, Arg-528, Leu-529 и Asp-530 вовлечены в свя-

зывание и активацию  $G_q$ -белка, поскольку их замена на аланин снижает или полностью блокирует вызываемую ТТГ стимуляцию фосфоинозитидного обмена, осуществляемую через  $G_q$ -белок (Neumann et al., 2005b). Делеции сегментов 522—525, 526—530 и 531—534, а также множественные замены АКО в сегментах 522—525 и 526—530 на остатки аланина приводили к мутантным рецепторам с резко сниженной способностью активировать  $G_s$ -белки и стимулировать цАМФ-зависимые сигнальные каскады. Совокупность полученных данных позволила сделать вывод о том, что N-концевая часть ЦП-2 в большей степени важна для активации  $G_s$ -белков, в то время как центральная часть петли — для активации  $G_q$ -белков. При этом гидрофобные остатки Phe-525, Met-527 и Leu-529 взаимодействуют с гидрофобными остатками Leu-343 и Leu-347, локализованными в С-концевом сегменте  $\alpha$ -субъединицы  $G_q$ -белка, в то время как заряженные остатки Arg-528 и Asp-530 — с гидрофильными АКО, которые локализованы в  $\beta_2/\beta_3$ -петле,  $\alpha_5$ -спирали и в N- и С-концевых сегментах этой субъединицы (Claus et al., 2006). Показано, что ЦП-2 не только взаимодействует с молекулой G-белка, но также контактирует с ЦП-3 и влияет на ее способность связываться с G-белками и стимулировать их активность. Так, например, Phe-525 взаимодействует с Thr-607, расположенным в N-концевом участке ЦП-3, который является важнейшей молекулярной детерминантой для активации  $G_q$ -белка (Neumann et al., 2005b).

Третья цитоплазматическая петля. Получены многочисленные свидетельства в пользу того, что ключевую роль во взаимодействии LGR-рецепторов с G-белками, как и в большинстве других сопряженных с G-белками рецепторах серпантинного типа, играет ЦП-3, в первую очередь ее С-концевой сегмент, содержащий ВВХХВ-мотив, в котором В — положительно заряженный АКО, обычно аргинин или лизин (Chazenbalk et al., 1991; Kosugi et al., 1993; Grasso et al., 1995a, 1995b, 1995c; Beau et al., 1998; Nakamura et al., 1998b; Schultz et al., 2000; Bhaskaran et al., 2003; Cohen et al., 2003; Krishnamurthy et al., 2003; Timossi et al., 2004; Шпаков и др., 2005, 2006; Claus et al., 2006; Shpakov, Pertseva, 2007; Ulloa-Aguirre et al., 2007). Сравнительный анализ первичных структур ЦП-3 LGR-рецепторов показывает, что в отличие от ЦП-3 релаксиновых рецепторов в рецепторах гонадотропинов и ТТГ отсутствует N-концевой сегмент петли (рис. 2). Вследствие этого высококонсервативный среди всех рецепторов дуплет RN в релаксиновых рецепторах находится в середине петли, а в рецепторах ЛГ, ФСГ и ТТГ — вблизи TM5. В релаксиновых рецепторах также видоизменен и ВВХХВ-мотив, который в рецепторах гликопротеиновых гормонов имеет каноническую форму (K/R)IAKR.

О важности мотивов ВВХХВ-типа, локализованных в С-концевых участках ЦП-3 LGR-рецепторов, для взаимодействия с различными типами G-белков свидетельствуют как результаты исследований с мутантными формами рецептора, так и изучение синтетических пептидов, соответствующих этому сегменту. Следует отметить, что такие мотивы в проксимальных участках ЦП других рецепторов серпантинного типа играют определяющую роль в их взаимодействии с различными классами G-белков (Шпаков, 2002, 2003).

Одиночные замены высококонсервативных остатков Arg-552 и Arg-556, которые формируют ВВХХВ-мотив в С-концевом участке ЦП-3 рецептора ФСГ, нарушают его

функциональное взаимодействие с  $G_s$ -белками и снижают стимуляцию гормоном активности АЦ (Beau et al., 1998; Cohen et al., 2003; Timossi et al., 2004). В то же время замена остатка Lys-555 в рецепторе ФСГ и соответствующих ему остатков лизина в рецепторах ЛГ (Lys-552) и ТТГ (Lys-624) на аланин слабо влияет на их сопряжение с  $G_s$ -белками, но при этом усиливает интернализацию рецептора и влияет на его сродство к лиганду (Chazenbalk et al., 1991; Schultz et al., 2000; Cohen et al., 2003; Timossi et al., 2004). Замены остатков Lys-570 в рецепторе ЛГ и Arg-625 в рецепторе ТТГ, соответствующих Arg-556 в рецепторе ФСГ, частично (в случае рецептора ЛГ) или полностью (в случае рецептора ТТГ) нарушают его сопряжение с  $G_s$ -белками и блокируют вызываемую гормоном активацию цАМФ-зависимых сигнальных каскадов. В то же время в отличие от рецептора ФСГ замены остатков Lys-566 в рецепторе ЛГ и Lys-621 в рецепторе ТТГ, соответствующих Arg-552 в рецепторе ФСГ, не снижают стимуляцию гормоном активности АЦ. Замена на аланин всех трех положительно заряженных АКО (Arg-552, Lys-555 и Arg-556 в рецепторе ФСГ и Lys-621, Lys-624 и Arg-625 в рецепторе ТТГ) полностью блокирует стимуляцию гормонами активности АЦ и нарушает процессинг молекулы рецептора в клетке (Chazenbalk et al., 1991; Timossi et al., 2004).

В рецепторе ТТГ ВВХХВ-мотив и окружающие его АКО участвуют во взаимодействии не только с  $G_s$ -, но и с  $G_q$ -белками (Claus et al., 2006). Замены остатков Lys-621 и Leu-622 на аланин, нарушающие структуру ВВХХВ-мотива, введение в этот мотив отрицательно заряженной АКО вследствие мутации I622D, а также замена предшествующего ВВХХВ-мотиву положительно заряженного Lys-618 (K618A) блокируют взаимодействие мутантного рецептора с  $G_q$ -белком и вызываемую гормоном стимуляцию фосфоинозитидного обмена. Моделирование комплекса активированного гормоном рецептора и  $\alpha$ -субъединицы  $G_q$ -белка показывает, что определяющую роль в его стабилизации играют электростатические взаимодействия между положительно заряженными остатками Lys-618 и Lys-621 С-концевого участка ЦП-3 рецептора и отрицательно заряженными остатками Asp-313 и Asp-315  $\beta_5/\beta_6$ -петли  $\alpha_q$ -субъединицы. Наряду с С-концевым участком ЦП-3 во взаимодействие с  $G_q$ -белком вовлечен и N-концевой участок этой петли, который не столь важен для связывания и активации  $G_s$ -белка (Biebermann et al., 1998; Claus et al., 2006). Замены на аланин остатков Leu-604, Tyr-605 и Val-608, расположенных на границе TM5 и ЦП-3, приводят к значительному снижению стимулирующего эффекта гормона на фосфоинозитидный обмен. Для мутантного рецептора с заменой I604A этот эффект снижается в 6 раз.

Как и в случае рецептора ТТГ, функциональная активность рецепторов гонадотропинов и их взаимодействие с G-белками меняются при замене АКО, расположенных вблизи ВВХХВ-мотива. Замена предшествующего ВВХХВ-мотиву остатка Asp-550 в рецепторе ФСГ приводит к конституционно активным формам рецепторов, что, как полагают, является следствием дестабилизации С-концевой спирали ЦП-3 и нарушения ее взаимодействия с другими сегментами, формирующими G-белоксвязывающий сайт рецептора (Gromoll et al., 1996; Schultz et al., 2000; Haywood et al., 2002). Соответствующий остаток Asp-564 в рецепторе ЛГ участвует в связывании с  $G_s$ -белком (Angelova et al., 2008). Показано также, что этот остаток определяет взаимодействие рецептора ЛГ с аррести-



	TM4	BP-2	TM5
1	527	RTITVLLIWIITGFIVAFIPLSNKEFFKNYYGTNGVCFPLHSEDTESIGAQIYSVAIFLG	
2	537	QTSVILICIWMAGFLIAVIPFWNKDYFGNFYKNGVCFPLYDQTEDIGSKGYSLGIFLG	
3	485	HAASVMVGWIFAFAAALFPIFG----ISSYMKVSIICLPM---DIDSPLSQLYVMSLLV-	
4	482	HAILIMLGGWLFSSLIAMLPVGV---VSNYMKVSIICFPM---DVETTLSQVYILTILI-	
5	537	HACAIMVGGWVCCFLALLPLVGV---ISSYAKVSIICLPM---DTETPLALAYIVFVLT-	
		**    ***    +    ****+    +    *    *    +    *    **+    +*    *    *    +    *    *    *	
		ЦП-3	TM6
1	587	INLAAFIIIVFSYGSMFYSVHQSAITATEIRNQ-V---KKEMILAKRFFFIVFTDALCWI	
2	597	VNLLAFLIIVFSYITMFCSIQKTALQTTEVRNC-F---GREVAVANRFFFIVFSDAICWI	
3	537	LNVLAFVVICGCIYIHIYLTV-----RNPNIIVSSSDTRIAKRMAMLIFTDFLCMA	
4	534	LNVVAFFIICACYIKIYFAV-----RNPELMATNKDTKIAKKMAILIFTDFTCMA	
5	589	LNIVAFVIVCCYVKIYITV-----RNPQYNPGDKDTKIAKRMAVLIIFTDFICMA	
		*+****+    ***    +*    **    **    +    +    **    *+**    **+**    *    *	
		BP-3	TM7
1	643	PIFVVKFLSLLQVEIPGTITSWVVIFIL--PINSALNPILYTLTTRPFKEMIHFRWYNYR	СКД
2	653	PVFVVKILSLFRVEIPDTMTSWIVIFFL--PVNSALNPILYTLTTFNFKDKLQQLLHKH-	
3	587	PISFFAISASLKVPLI-TVSKAKILLVLFHPINSCANPFLYAIFTKNFRRDFFILLSKCG	
4	584	PISFFAISAAFVPLI-TVTNSKVVLLVLFYPINSCANPFLYAIFTKTFQRDFFILLSKFG	
5	639	PISFYALSAILNKPLI-TVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFG	
		+*    *    ****    +**    **    +    +++++++    +++*    +*    +*    **    *	
1	701	QRKSMD--KGQKTYAPSEFIWV	720
2	710	QRKSIFKI-K-KKSLSTSIVWI	729
3	646	CYEMQAQIYR---TETSSTVHN	664
4	643	CCKRRAELYR-RKDFSAYTSNC	663
5	698	ICKRQAQAYRGQRVPPKNSTDI	719
		*    *    *    *	

Рис. 2 (продолжение).

ном-2, поскольку его замена на глицин приводит к нарушению такого взаимодействия, что в свою очередь ведет к нарушению процесса десенситизации рецептора и влияет на эффективность и селективность его взаимодействия с  $G_s$ -белками (Mukherjee et al., 2002).

В пользу ключевой роли ЦП-3 рецептора ФСГ и локализованного в ней BVXXB-мотива во взаимодействии с G-белками свидетельствует то, что пептид 533—555, соответствующий всей ЦП-3 рецептора ФСГ, и его укороченный аналог 551—555, включающий в себя только BVXXB-мотив, влияют на передачу генерируемого ФСГ сигнала в тестикулярной ткани крыс и культуре клеток Сертоли. Оба пептида отчетливо стимулируют функциональную активность G-белков и конкурируют с рецептором за места связывания на молекуле  $G_s$ -белка, что ведет к снижению в присутствии пептидов стимулирующего влияния гормона на активность АЦ и продукцию стероидных гормонов (Grasso et al., 1995b, 1995c). При этом пептиды непосредственно с рецептором и ферментом АЦ не взаимодействуют, о чем свидетельствует отсутствие их влияния на связывающие характеристики рецептора и стимулированную форсколином активность АЦ. Пептиды также не влияют на базальный и стимулированный форсколином уровень стероидогенеза в клетках Сертоли. Присоединение катионных фрагментов к N-концу пептида KIAKR(551—555) (заряд +3) меняет эффективность его действия. Показано, что пептиды RA-KIAKR и HA-RA-KIAKR (заряды +4 и +5 соответственно) превосходят

немодифицированный пептид по стимулирующему влиянию на ГТФ-связывание G-белков, но при этом являются менее эффективными ингибиторами стимулированного ФСГ стероидогенеза (Grasso et al., 1995a).

Нами были синтезированы поликатионные пептиды QVKKK(Nle)ILAKR(619—629) и EIRNQVKKK(Nle)ILAKR(615—629), соответствующие по первичной структуре C-концевому участку ЦП-3 релаксинового рецептора RXFP1 (LGR7) (Шпаков и др., 2005, 2006; Shpakov et al., 2007). Основываясь на том, что присутствие гидрофобного радикала повышает биологическую активность пептидов, производных ЦП рецепторов (Covic et al., 2002), в структуру пептида 619—629 был введен лизин, модифицированный остатком пальмитиновой кислоты. Пептиды 619—629-Lys(Palm) и 615—629 в микромолярном диапазоне концентраций в отсутствие гормона стимулировали активность АЦ и ГТФ-связывание G-белков (действие пептида 619—629 было выражено слабо). В миокарде и мозге крысы пептиды 619—629-Lys(Palm) и 615—629 ингибировали стимуляцию релаксином G-белков и АЦ, конкурируя с рецептором RXFP1 за места связывания на молекуле  $G_s$ -белка. В скелетных мышцах, где действие релаксина, как показано нами (Shpakov et al., 2005; Pertseva et al., 2006), осуществляется через другой тип релаксиновых рецепторов, пептиды оказались неэффективными, что свидетельствует о высокой селективности их действия и позволяет применять их для идентификации типа рецептора, через который релаксин реализует свои регу-

ляторные эффекты на клетку. Полученные нами данные указывают на то, что С-концевой участок ЦП-3 рецептора RXFP1 непосредственно участвует во взаимодействии с  $G_s$ -белками и ответствен за передачу релаксинового сигнала к АЦ.

С-концевой домен СКД рецепторов гликопротеиновых гормонов обогащен остатками серина и треонина — мишенями для фосфорилирования протеинкиназами. Следует, однако, отметить, что если СКД рецептора ЛГ фосфорилирован, то СКД рецептора ФСГ, напротив, в функционально активном состоянии остается нефосфорилированным (Nakamura et al., 1998a, 1998b). Проксимальный к мембране участок СКД в рецепторе ФСГ содержит обращенный ВВХХВ-мотив (KNFRR, 614—618), который, как полагают, так же как и соответствующие ему мотивы в ЦП-2 и ЦП-3, может участвовать во взаимодействии с G-белками. Наряду с ним в СКД имеются и другие катионные участки, которые способны активировать G-белки, на что указывают данные, полученные с помощью синтетических пептидов (Grasso et al., 1995a, 1995b). Показано, что пептид 645—653 и его укороченный аналог 650—653 (RKSH) активируют  $G_s$ -белки и снижают стимулированные гормоном активность АЦ и стероидогенез в тестикулах крыс и культуре клеток Сертоли. Они, как и пептиды 533—555 и 551—555, соответствующие С-концевому участку ЦП-3, не взаимодействуют с рецептором и АЦ. В отличие от пептида 551—555 присоединение к пептиду 650—653 катионных фрагментов приводит к изменению не только эффективности, но и селективности его действия. Так, действие пептидов НА-RKSH и НА-НА-RKSH является противоположным по отношению к таковому пептида RKSH(650—653). Оно ингибирует активность G-белков и повышает как базальный, так и стимулированный гормоном уровень эстрадиола в клетках Сертоли (Grasso et al., 1995a). Эти данные указывают на то, что введение катионных фрагментов в пептиды, производные ЦП рецепторов серпантинного типа, может заметно изменить не только эффективность, но и селективность их действия.

N-концевой участок СКД в рецепторе ФСГ важен также для нормального протекания посттрансляционного процессинга рецепторной молекулы, тем более что включенный в этот мотив остаток Phe-616 является N-концевой аминокислотой в высококонсервативном мотиве  $F(X)_6LL$ , который требуется для транспорта рецептора через мембрану. Замена остатка Lys-614 в этом мотиве на аланин на 60 % снижает содержание мембранно-связанной формы рецептора и уровень связывания лиганда, а также ослабляет вызываемую ФСГ стимуляцию активности АЦ (Timossi et al., 2004; Ulloa-Aguirre et al., 2007). К сходному результату приводят и замены остатков Arg-617 и Arg-618, нарушающие целостность обращенного ВВХХВ-мотива. В рецепторах ЛГ и ТТГ мотивы, обогащенные положительно заряженными АКО, отсутствуют, хотя мотив  $F(X)_6LL$  сохранен.

Важнейшей особенностью структуры СКД рецепторов гонадотропинов является присутствие в них двух высококонсервативных остатков цистеина, которые участвуют в образовании дисульфидной связи — между Cys-629 и Cys-655 в рецепторе ФСГ и между Cys-644 и Cys-663 в рецепторе ЛГ. В рецепторе ТТГ такая дисульфидная связь не образуется. Остатки Cys-629 в рецепторе ФСГ, Cys-644 в рецепторе ЛГ и Cys-699 в рецепторе ТТГ, как полагают, являются сайтами для пальмитоилирования, тем более что по соседству с ними во всех рецепто-

рах локализованы высококонсервативные положительно заряженные остатки лизина (Lys-626, Lys-645 и Lys-700 соответственно), присутствие которых необходимо для эффективного ацилирования SH-группы цистеина (Belanger et al., 2001). В пользу этого свидетельствуют следующие факты. Замена остатка Cys-629 в рецепторе ФСГ на аланин на 20—30 % снижает вызываемое гормоном повышение уровня цАМФ, снижает аффинность рецептора к ФСГ и нарушает процессинг рецепторной молекулы в клетке (Ulloa-Aguirre et al., 2007). Замена остатков Cys-644 и Cys-699 в рецепторах ЛГ и ТТГ, которые в функционально активном состоянии пальмитоилированы, на другие АКО также приводит к нарушению процессинга рецепторных молекул и потере ими биологической активности (Tanaka et al., 1998; Galet et al., 2004). Сходная ситуация наблюдается и для сопряженного с  $G_s$ -белком  $\beta_2$ -адренергического рецептора, поскольку модификация пальмитатом приводит к формированию четвертой, дополнительной, ЦП, которая участвует в формировании G-белоксвязывающей поверхности рецептора и обеспечивает оптимальную фиксацию рецепторной молекулы в мембране, что необходимо для ее дальнейшего процессинга (Ulloa-Aguirre et al., 1998). Вероятно, в рецепторах гликопротеиновых гормонов также формируется четвертая ЦП, которая либо сама непосредственно взаимодействует с молекулой G-белка, либо влияет на формирование оптимальной G-белоксвязывающей поверхности другими цитоплазматическими участками рецептора.

В пользу важности N-концевой части СКД свидетельствуют данные, полученные при исследовании мутантных рецепторов ТТГ с делециями в СКД (Kosugi, Morigi, 1994b). Мутантный рецептор, лишенный значительной части СКД (710—764), не способен активировать  $G_q$ -белки, стимулировать фосфоинозитидный обмен, очень слабо взаимодействует с  $G_s$ -белками, следствием чего является низкий уровень стимуляции им АЦ. В свою очередь мутантный рецептор с делецией 722—764 эффективно взаимодействует с обоими типами G-белков и активирует сопряженные с ними сигнальные каскады. Таким образом, для эффективного взаимодействия с  $G_s$ - и  $G_q$ -белками в рецепторе ТТГ необходимы N-концевой участок СКД, предположительно формирующий четвертую петлю, и следующий за ним участок (до Val-721), обогащенный положительно заряженными АКО.

Трансмембранные домены рецепторов. TM LGR-рецепторов сами непосредственно во взаимодействии с G-белками не участвуют, но играют важную роль в обеспечении оптимальной конформации G-белоксвязывающей поверхности, образуемой цитоплазматическими участками рецептора, а также в формировании рецепторными молекулами олигомерных комплексов, что, как полагают, необходимо для эффективного взаимодействия рецептора с гормоном и G-белком. Основной вклад во взаимодействие с G-белками вносят интерфейсы, локализованные на границе TM и ЦП рецепторов, а также АКО, предшествующие этим интерфейсам.

В рецепторе ТТГ важную роль во взаимодействии с различными типами G-белков играет сегмент 600—602, расположенный на границе TM5 и ЦП-3 (Biebermann et al., 1998; Kaczur et al., 2003; Knudsen, Farud, 2004; Jaeschke et al., 2008). Замена Cys-600 в этом сегменте приводит к потере чувствительности рецептора к гормону, а замена Tug-601 ведет к нарушению его сопряжения с  $G_s$ - и  $G_{q/11}$ -белками. Так, стимулирующие эффекты ТТГ на АЦ и фосфоинозитидный обмен при активации им рецептора



с мутацией Y601N снижены в 2 и 5 раз соответственно (Jaeschke et al., 2008). К снижению на 50 % и более стимулирующего эффекта гормона на продукцию фосфоинозитидов ведут замены остатков Leu-512 (TM3/ЦП-2-интерфейс) и Asn-674 (TM7/СКД-интерфейс) на аспарагин и аспарагиновую кислоту соответственно. При замене сразу двух АКО в TM/ЦП-интерфейсах, как правило, наблюдаются многократное повышение базальной активности рецептора (в случае активации им АЦ в 10—25 раз) и резкое снижение его чувствительности к регуляторному влиянию гормона, что указывает на синергичность эффектов таких замен на функции рецептора ТТГ. Стимулирующие АЦ и фосфоинозитидный обмен эффекты ТТГ при активации им рецепторов с двойными мутациями G431S/Y601N, M453T/Y601N, M453T/N674D, S505N/Y601N, L512Q/Y601N и Y601N/A623V снижены в 1.6—2.7 и 6—12 раз соответственно. Анализ мутантных рецепторов показывает, что для взаимодействия рецептора с  $G_s$ -белками наиболее важны АКО, локализованные в TM2, TM6 и TM7, а для взаимодействия с  $G_q$ -белками — АКО, расположенные в TM1, TM2, TM3 и TM6 (Jaeschke et al., 2008).

В рецепторе ЛГ важную роль в формировании G-белоксвязывающей поверхности играют расположенные в TM3/ЦП-2-интерфейсе остатки Ile-460, Thr-461, Glu-463 и Arg-464, локализованный в TM5/ЦП-3-интерфейсе остаток Tyr-550 и расположенные в ЦП-3/TM6-интерфейсе остатки Lys-563 и Asp-564, замены которых приводят к нарушению взаимодействия мутантного рецептора с  $G_s$ -белком и определяют базальную активность рецептора (Zhang et al., 2005; Puett et al., 2007; Angelova et al., 2008). Боковые цепи остатков Arg-464 и Asp-564 образуют ионную связь, которая определяет взаимную ориентацию TM3 и TM6 и, следовательно, конформацию всего трансмембранного канала. При этом площадь доступного для растворителя цитоплазматического входа в трансмембранный канал составляет 2800 нм<sup>2</sup>, а проксимальные к мембране участки ЦП-2 и ЦП-3 рецептора формируют функционально активный G-белоксвязывающий сайт. При связывании рецептора агонистом вследствие изменения конформации трансмембранного канала происходит перераспределение ионных связей между интерфейсами и площадь входа в канал превышает 5000 нм<sup>2</sup>, что в свою очередь вызывает изменение структуры G-белоксвязывающего сайта, инициирует его взаимодействие с C-концевым сегментом  $\alpha$ -субъединицы G-белка и активирует в ней ГДФ/ГТФ-обмен. При замене D564G ионная связь не образуется, что нарушает ассоциацию между TM3/ЦП-2 и ЦП-3/TM6-интерфейсами и увеличивает площадь цитоплазматического входа в трансмембранный канал до 12 000 нм<sup>2</sup>. Следствием этого являются переход рецептора в конституционно активное состояние и перманентная активация им  $G_s$ -белков (Puett et al., 2007).

## Закключение

LGR-рецепторы относятся к группе рецепторов серпантинного типа, отличающихся от других рецепторов наличием множества LRR-повторов во внеклеточном домене. Эти повторы вместе с внеклеточными петлями серпантинного домена рецепторов формируют объемный лигандсвязывающий сайт, с которым связываются гормоны пептидной природы — значительные по размеру гипофизарные гликопротеиновые гормоны (ЛГ, ФСГ и ТТГ) или

относительно небольшие пептиды релаксин и родственный ему инсулиноподобный фактор 3, относящиеся к пептидным гормонам инсулинового суперсемейства. В то время как активация большинства рецепторов серпантинного типа является результатом взаимодействия гормональной молекулы с лигандсвязывающим сайтом, расположенным внутри трансмембранного канала рецептора, в случае LGR-рецепторов гормон активирует трансмембранный канал опосредованно, изменяя конформацию внеклеточных петель рецептора. Важно отметить, что по крайней мере некоторые LGR-рецепторы, в частности рецептор ТТГ, обладают высокой базальной активностью и могут функционировать в отсутствие гормонального стимула. Такая модель активации LGR-рецепторов предусматривает наличие других классов регуляторов, которые, обладая меньшими размерами, способны проникать в трансмембранный канал рецептора и активировать его по механизму, не зависящему от внеклеточного домена. Действительно, для рецепторов гонадотропинов и ТТГ такие регуляторы в настоящее время обнаружены, причем эффективность и селективность их действия сопоставимы с таковыми гликопротеиновых гормонов. Более того, среди таких низкомолекулярных регуляторов выявлены вещества с активностью как агонистов, так и антагонистов.

Эти результаты имеют как теоретическое, так и прикладное значение. Сохранение функционально активного лигандсвязывающего сайта в трансмембранном канале LGR-рецепторов указывает на то, что эволюционными предшественниками LGR-рецепторов (а все они произошли от общего анцестрального гена) были классические рецепторы серпантинного типа, регуляция которых осуществлялась по механизму, сходному с таковым для рецепторов биогенных аминов и небольших пептидов. В связи с этим можно предположить, что лигандсвязывающий сайт, локализованный в трансмембранном канале LGR-рецепторов, по своему происхождению является первичным сайтом, в то время как сайт, расположенный в массивном внеклеточном домене, сформировался позже и потому является вторичным. В этой связи следует отметить, что разработка низкомолекулярных регуляторов LGR-рецепторов, взаимодействующих с их первичным сайтом, является перспективным направлением для создания на их основе лекарств, которые могут быть применены для лечения заболеваний и дисфункций, связанных с нарушением функций, контролируемых гонадотропинами, ТТГ и релаксином.

Изучение взаимодействия LGR-рецепторов с различными типами гетеротримерных G-белков позволило выявить молекулярные детерминанты, ответственные за такое взаимодействие, и установить лежащие в его основе молекулярные механизмы. Так, в ЦП и TM/ЦП-интерфейсах рецептора ТТГ, сопряженного с представителями всех известных классов G-белков ( $G_s$ ,  $G_q$ ,  $G_{i/o}$  и  $G_{12/13}$ ), выявлены АКО и их кластеры, которые ответственны за селективность такого взаимодействия и замены которых ведут к нарушению функциональной активности рецептора и как следствие — к развитию эндокринных заболеваний. С помощью методов молекулярной механики установлена пространственная структура G-белоксвязывающих сайтов рецепторов ТТГ и гонадотропинов и предложена динамическая модель активации G-белков этими рецепторами. В основе этой модели лежит кооперативное взаимодействие между проксимальными к мембране участками ЦП-2, ЦП-3 и СКД активированного лигандом рецептора,

с одной стороны, и различными участками  $\alpha$ -субъединицы G-белка — с другой. Так, в случае сопряжения рецептора ТТГ с  $G_q$ -белком определяющую роль играют взаимодействия между С-концевым участком ЦП-3 рецептора и  $\beta_5/\beta_6$ -петлей  $\alpha_q$ -субъединицы, между остатками 523—531 ЦП-2 рецептора и  $\beta_2/\beta_3$ -петлей и N-концевой спиралью  $\alpha_q$ -субъединицы и между ЦП-2/ТМ3- и ЦП-3/ТМ6-интерфейсами рецептора и С-концевым сегментом  $\alpha_q$ -субъединицы (Claus et al., 2006). Сходная модель предлагается и для рецептора ЛГ (Puett et al., 2007).

Несмотря на сложную организацию G-белоксвязывающего сайта, включающего в себя множество молекулярных детерминант со строго определенными функциями, за активацию G-белка отвечают сравнительно небольшие участки ЦП LGR-рецепторов, которые с высокой селективностью и эффективностью взаимодействуют с участками  $\alpha$ -субъединицы G-белка, ответственными за ГДФ/ГТФ-обмен и последующую активацию G-белка. В пользу этого свидетельствуют данные по изучению сравнительно коротких синтетических пептидов, соответствующих участкам ЦП-3 рецепторов ТТГ и релаксина (RXFP1), которые не только конкурируют с молекулой рецептора за связывание с молекулой G-белка, но и сами в отсутствие гормона селективно активируют G-белки и запускают сопряженные с ними сигнальные каскады (Grasso et al., 1995a, 1995b, 1995c; Шпаков и др., 2005, 2006; Shpakov et al., 2007). На основе таких пептидов в дальнейшем предполагается разработать высокоселективные регуляторы функций LGR-рецепторов, влияющие на пострецепторные этапы передачи гормонального сигнала.

Подводя итоги, необходимо отметить, что достижения последних лет в сфере изучения структурно-функциональной организации LGR-рецепторов и молекулярных механизмов их взаимодействия с G-белками закладывают основы для разработки новых подходов для направленного влияния на функциональную активность LGR-рецепторов и контролируемых ими биохимических и физиологических процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (2009 г.), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00746а) и Фонда содействия отечественной науке.

### Список литературы

- Шпаков А. О. 2002. Молекулярные детерминанты в рецепторах серпантинного типа, ответственные за их функциональное сопряжение с гетеротримерными G-белками. Цитология. 44 (3) : 242—258.
- Шпаков А. О. 2003. Участие заряженных аминокислотных остатков цитоплазматических петель серпантинного типа в процессе передачи гормонального сигнала. Журн. эволюц. биохим. физиол. 38 : 205—217.
- Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Кузнецова Л. А., Плещева С. А., Шпакова Е. А., Власов Г. П., Перцева М. Н. 2006. Регуляция функциональной активности чувствительной к релаксину аденилатциклазы пептидами, производными релаксинового рецептора LGR7. Докл. РАН. 407 : 835—838.
- Шпаков А. О., Перцева М. Н., Гурьянов И. А., Власов Г. П. 2005. Влияние пептидов, производных третьей цитоплазматической петли релаксинового рецептора I типа, на стимуляцию релаксином GTP-связывающей активности G-белков. Биол. мембраны. 22 : 435—442.
- Angelova K., Fanelli F., Puett D. 2008. Contribution of intracellular loops 2 and 3 of the lutropin receptor in  $G_s$  coupling. Mol. Endocrinol. 22 : 126—138.
- Ascoli M., Fanelli F., Segaloff D. L. 2002. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. Endocrinol. Rev. 23 : 141—174.
- Bathgate R. A., Ivell R., Sanborn B. M., Sherwood O. D., Summers R. J. 2006. Recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. Pharmacol. Rev. 58 : 7—31.
- Beau I., Touraine P., Meduri G., Gougeon A., Desroches A., Matuchansky C., Milgrom E., Misrahi M. 1998. A novel phenotype related to partial loss of functional mutations of the follicle-stimulating hormone receptor. J. Clin. Invest. 102 : 1352—1359.
- Belanger C., Ansanay H., Qanbar R., Bouvier M. 2001. Primary sequence requirements for S-acylation of  $\beta_2$ -adrenergic receptor peptides. FEBS Lett. 499 : 59—64.
- Bhaskaran R. S., Min L., Krishnamurthy H., Ascoli M. 2003. Studies with chimeras of the gonadotropin receptors reveal the importance of third intracellular loop threonines on the formation of the receptor/nonvisual arrestin complex. Biochemistry. 42 : 13 950—13 958.
- Biebermann H., Schoneberg T., Schulz A., Krause G., Gruters A., Schultz G., Gudermann T. 1998. A conserved tyrosine residue (Y601) in transmembrane domain 5 of the human thyrotropin receptor serves as a molecular switch to determine G-protein coupling. FASEB J. 12 : 1461—1471.
- Buch T. R., Biebermann H., Kalwa H., Pinkenburg O., Hager D., Barth H., Aktories K., Breit A., Gudermann T. 2008.  $G_{13}$ -dependent activation of MAPK by thyrotropin. J. Biol. Chem. 283 : 20330—20341.
- Bullesbach E. E., Schwabe C. 2005. The trap-like relaxin-binding site of LGR7. J. Biol. Chem. 280 : 14 856—14 890.
- Chazenbalk G. D., Nagayama Y., Wadsworth H., Russo D., Rapoport B. 1991. Signal transduction by the human thyrotropin receptor: studies on the role of individual amino acid residues in the carboxyl terminal region of the third cytoplasmic loop. Mol. Endocrinol. 5 : 1523—1526.
- Claeysen S., Govaerts C., Lefort A., Van Sande J., Costagliola S., Pardo L., Vassart G. 2002. A conserved Asn in TM7 of the thyrotropin receptor is a common requirement for activation by both mutations and its natural agonist. FEBS Lett. 517 : 195—200.
- Claus M., Neumann S., Kleinau G., Krause G., Paschke R. 2006. Structural determinants for G-protein activation and specificity in the third intracellular loop of the thyroid-stimulating hormone receptor. J. Mol. Med. 84 : 943—954.
- Cohen B. D., Bariteau J. T., Magen L. M., Dias J. A. 2003. Regulation of follitropin receptor cell surface residency by the ubiquitin-proteasome pathway. Endocrinology. 144 : 4393—4402.
- Costagliola S., Urizar E., Mendive F., Vassart G. 2005. Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors. Reproduction. 130 : 275—281.
- Covic L., Misra M., Badar J., Singh C., Kuliopulos A. 2002. Peptidic-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. Nat. Med. 8 : 1161—1165.
- Davies T. F., Ando T., Lin R. Y., Torner Y., Latif R. 2005. Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomas to Graves disease. J. Clin. Invest. 115 : 1972—1983.
- Dhanawada K. R., Vijapurkar U., Ascoli M. 1996. Two mutations of the lutropin/choriogonadotropin receptor that impair signal transduction also interfere with receptor-mediated endocytosis. Mol. Endocrinol. 10 : 544—554.
- Dias J. A., Cohen B. D., Lindau-Shepard B., Nechamen C. A., Peterson A. J., Schmidt A. 2002. Molecular, structural, and cellular biology of follitropin and follitropin receptor. Vitam. Horm. 64 : 249—322.
- Farid N. R., Kaczur V., Balazs C. 2000. The human thyrotropin receptor is highly mutable: a review of gain-of-function mutations. Eur. J. Endocrinol. 143 : 25—30.
- Farid N. R., Szkudlinski M. W. 2004. Minireview: structural and functional evolution of the thyrotropin receptor. Endocrinology. 145 : 4048—4057.

- Fernandez L. M., Puett D. 1997. Evidence for an important functional role of intracellular loop II of the lutropin receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 128 : 161—169.
- Galet C., Hirakawa T., Ascoli M. 2004. The postendocytotic trafficking of the human lutropin receptor is mediated by a transferable motif consisting of the C-terminal cysteine and an upstream leucine. *Mol. Endocrinol.* 18 : 4343—4346.
- Grasso P., Deziel M. R., Reichert L. E. 1995a. Selective effects of charge on G protein activation by FSH-receptor residues 551—555 and 650—653. *Pept. Res.* 8 : 278—284.
- Grasso P., Deziel M. R., Reichert L. E. 1995b. Synthetic peptides corresponding to residues 551 to 555 and 650 to 653 of the rat testicular follicle-stimulating hormone (FSH) receptor are sufficient for post-receptor modulation of Sertoli cell responsiveness to FSH stimulation. *Regul. Pept.* 60 : 177—183.
- Grasso P., Leng N., Reichert L. E. 1995c. A synthetic peptide corresponding to the third cytoplasmic loop (residues 533 to 555) of the testicular follicle-stimulating hormone receptor affects signal transduction in rat testis membranes and in intact cultured rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 110 : 35—41.
- Gromoll J., Simoni M., Nieschlag E. 1996. An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 : 1367—1370.
- Halls M. L., Bathgate A. D., Summers R. J. 2006. Relaxin family peptide receptors RXFP1 and RXFP2 modulate cAMP signaling by distinct mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 70 : 214—226.
- Halls M. L., Bond C. P., Sudo S., Kumagai J., Ferraro T., Layfield S. 2005. Multiple binding sites revealed by interaction of relaxin family peptides with native and chimeric relaxin family peptide receptors 1 and 2 (LGR7 and LGR8). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313 : 677—687.
- Halls M. L., van der Westhuizen E. T., Bathgate A. D., Summers R. J. 2007. Relaxin family peptide receptors — former orphans reunite with their parent ligands to activate multiple signaling pathways. *Br. J. Pharmacol.* 150 : 677—691.
- Haywood M., Tymchenko N., Spaliviero J., Koch A., Jimenez M., Gromoll J., Simoni M., Nordhoff V., Handelsman D. J., Allan C. M. 2002. An activated human follicle-stimulating hormone (FSH) receptor stimulates FSH-like activity in gonadotropin-deficient transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 16 : 2582—2591.
- Heitman L. H., Ijzerman A. P. 2008. G protein-coupled receptors of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: a case for GnRH, LH, FSH, and GPR54 receptor ligands. *Med. Res. Rev.* 28 : 975—1011.
- Hsu S. Y. 2003. New insights into the evolution of the relaxin-LGR signaling system. *Trends Endocrinol. Metab.* 14 : 303—309.
- Hsu S. Y., Kudo M., Chen T., Nakabayashi K., Bhalla A., Van der Spek P. J. 2000. The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Mol. Endocrinol.* 14 : 1257—1271.
- Hsu S. Y., Nakabayashi K., Nishi S., Kumagai J., Kudo M., Sherwood O. D., Hsueh A. J. 2002. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science.* 295 : 671—674.
- Jaschke H., Kleinau G., Sontheimer J., Mueller S., Krause G., Paschke R. 2008. Preferences of transmembrane helices for cooperative amplification of  $G\alpha_s$  and  $G\alpha_q$  signaling of the thyrotropin receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* DOI 10.1007/s00018-008-8530-3.
- Kaczur V., Puskas L. G., Takacs M., Racz I. A., Szendroi A., Toth S., Nagy Z., Szalai C., Balazs C., Falus A., Knudsen B., Farid N. R. 2003. Evolution of the thyrotropin receptor: a G protein coupled receptor with an intrinsic capacity to dimerize. *Mol. Genet. Metab.* 78 : 275—290.
- Karges B., Gidenne S., Aumas C., Haddad F., Kelly P. A., Milgrom E., De Roux N. 2005. Zero-length cross-linking reveals that tight interactions between the extracellular and transmembrane domains of the LH receptor persist during receptor activation. *Mol. Endocrinol.* 19 : 2086—2098.
- Kawamura K., Kumagai J., Sudo S., Chun S. Y., Pisarska M., Morita H. 2004. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 7323—7328.
- Kleinau G., Claus M., Jaeschke H., Mueller S., Neumann S., Paschke R., Krause G. 2007. Contacts between extracellular loop two and transmembrane helix six determine basal activity of the thyroid-stimulating hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 282 : 518—525.
- Kleinau G., Jaeschke H., Mueller S., Raaka B. M., Neumann S., Paschke R., Krause G. 2008. Evidence for cooperative signal triggering at the extracellular loops of the TSH receptor. *FASEB J.* 22 : 2798—2808.
- Knudsen B., Farid N. R. 2004. Evolutionary divergence of thyrotropin receptor structure. *Mol. Genet. Metab.* 81 : 322—334.
- Kosugi S., Kohn L. D., Akamizu T., Mori T. 1994. The middle portion in the second cytoplasmic loop of the thyrotropin receptor plays a crucial role in adenylate cyclase activation. *Mol. Endocrinol.* 8 : 498—509.
- Kosugi S., Mori T. 1994a. The first cytoplasmic loop of the thyrotropin receptor is important for phosphoinositide signaling but not for agonist-induced adenylate cyclase activation. *FEBS Lett.* 341 : 162—166.
- Kosugi S., Mori T. 1994b. The amino-terminal half of the cytoplasmic tail of the thyrotropin receptor is essential for full activities of receptor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200 : 401—407.
- Kosugi S., Okajima F., Ban T., Hidaka A., Shenker A., Kohn L. D. 1993. Substitutions of different regions of the third cytoplasmic loop of the thyrotropin (TSH) receptor have selective effects on phosphoinositide and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate signal generation. *Mol. Endocrinol.* 7 : 1009—1020.
- Krishnamurthy H., Galet C., Ascoli M. 2003. The association of arrestin-3 with the follicle-stimulating hormone receptor depends on receptor activation and phosphorylation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 204 : 127—140.
- Kumagai J., Hsu S. Y., Matsumi H., Roh J. S., Fu P., Wade J. D., Bathgate R. A., Hsueh A. J. 2002. INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *J. Biol. Chem.* 277 : 31 283—31 286.
- Laugwitz K. L., Allgeier A., Offermanns S., Spicher K., Van Sande J., Dumont J. E., Schultz G. 1996. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 116—120.
- Luo C. W., Dewey E. M., Sudo S., Ewer J., Hsu S. Y., Honegger H. W., Hsueh A. J. 2005. Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 2820—2825.
- Mendive F. M., Van Loy T., Claeysen S., Poels J., Williamson M., Hauser F., Grimmelikhuijzen C. J., Vassart G., Vandenbroeck J. 2005. *Drosophila* molting neurohormone bursicon is a heterodimer and the natural agonist of the orphan receptor DLGR2. *FEBS Lett.* 579 : 2171—2176.
- Moore S., Jaeschke H., Kleinau G., Neumann S., Costanzi S., Jiang J. K., Childress J., Raaka B. M., Colson A., Paschke R., Krause G., Thomas C. J., Gershengorn M. C. 2006. Evaluation of small-molecule modulators of the luteinizing hormone/choriogonadotropin and thyroid stimulating hormone receptors: structure-activity relationships and selective binding patterns. *J. Med. Chem.* 49 : 3888—3896.
- Mukherjee S., Gurevich V. V., Preninger A., Hamm H. E., Bader M. F., Fazleabas A. T., Birnbaumer L., Hunzicker-Dunn M. 2002. Aspartic acid 564 in the third cytoplasmic loop of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor is crucial for phosphorylation-independent interaction with arrestin-2. *J. Biol. Chem.* 277 : 17 916—17 927.
- Nakamura K., Hipkin R. W., Ascoli M. 1998a. The agonist-induced phosphorylation of the rat follitropin receptor maps to the first and third intracellular loops. *Mol. Endocrinol.* 12 : 580—591.
- Nakamura K., Krupnick J. G., Benovic J. L., Ascoli M. 1998b. Signaling and phosphorylation-impaired mutants of the rat follitropin receptor reveal an activation- and phosphorylation-independent

but arrestin-dependent pathway for internalization. *J. Biol. Chem.* 273 : 24 346—24 354.

*Nechamen C. A., Dias J. A. 2003.* Point mutations in follitropin receptor result in ER retention. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201 : 123—131.

*Neumann S., Claus M., Paschke R. 2005a.* Interactions between the extracellular domain and the extracellular loops as well as the 6th transmembrane domain are necessary for TSH receptor activation. *Eur. J. Endocrinol.* 152 : 625—634.

*Neumann S., Krause G., Claus M., Paschke R. 2005b.* Structural determinants for G protein activation and selectivity in the second intracellular loop of the thyrotropin receptor. *Endocrinology.* 146 : 477—485.

*Nguyen B. T., Dessauer C. W. 2005.* Relaxin stimulates protein kinase C translocation: requirement for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production. *Mol. Endocrinol.* 19 : 1012—1023.

*Nguyen B. T., Yang L., Sanborn B. M., Dessauer C. W. 2003.* Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for biphasic stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate by relaxin. *Mol. Endocrinol.* 17 : 1075—1084.

*Nishi S., Hsu S. Y., Zell K., Hsueh A. J. 2000.* Characterization of two fly LGR (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor) proteins homologous to vertebrate glycoprotein hormone receptors: constitutive activation of wild-type fly LGR1 but not LGR2 in transfected mammalian cells. *Endocrinology.* 141 : 4081—4090.

*Oh D. Y., Kim K., Kwon H. B., Seong J. Y. 2006.* Cellular and molecular biology of orphan G protein-coupled receptors. *Int. Rev. Cytol.* 252 : 163—218.

*Pertseva M., Shpakov A., Kuznetsova L., Plesneva S., Omeljanuk E. 2006.* Adenylyl cyclase signaling mechanisms of relaxin and insulin action: similarities and differences. *Cell Biol. Int.* 30 : 533—540.

*Puett D., Li Y., DeMars G., Angelova K., Fanelli F. 2007.* A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260 : 126—136.

*Rajagopalan-Gupta R. M., Lamm M. L., Mukherjee S., Raseznick M. M., Hunzicker-Dunn M. 1998.* Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor-mediated activation of heterotrimeric guanine nucleotide binding proteins in ovarian follicular membranes. *Endocrinology.* 139 : 4547—4555.

*Rajagopalan-Gupta R. M., Mukherjee S., Zhu X., Ho Y. K., Hamm H., Birnbaumer M., Birnbaumer L., Hunzicker-Dunn M. 1999.* Roles of G<sub>i</sub> and G<sub>q/11</sub> in mediating desensitization of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in porcine ovarian follicular membranes. *Endocrinology.* 140 : 1612—1621.

*Rosengren K. J., Lin F., Bathgate R. A., Tregear G. W., Daly N. L., Wade J. D. 2003.* Solution structure and novel insights into the determinants of the receptor specificity of human relaxin-3. *J. Biol. Chem.* 278 : 5845—5851.

*Schulz A., Bruns K., Henklein P., Krause G., Schubert M., Gudermann T., Wray V., Shultz G., Schoneberg T. 2000.* Requirement of specific intrahelical interactions for stabilizing the inactive conformation of glycoprotein hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 275 : 3786—3789.

*Schulz A., Schoneberg T., Paschke R., Shultz G., Gudermann T. 1999.* Role of the third intracellular loop for the activation of gonadotropin receptors. *Mol. Endocrinol.* 13 : 181—190.

*Shpakov A. O., Gur'yanov I. A., Kuznetsova L. A., Plesneva S. A., Shpakova E. A., Vlasov G. P., Pertseva M. N. 2007.* Studies of the molecular mechanisms of action of relaxin on the adenylyl cyclase signaling system using synthetic peptides derived from the LGR7 relaxin receptor. *Neurosci. Behav. Physiol.* 37 : 705—714.

*Shpakov A. O., Pertseva M. N. 2007.* The peptide strategy as a novel approach to the study of G protein-coupled signaling systems. In: *Signal transduction research trends* (Ed. N. O. Grachevsky). Nova Sci. Publ., Inc. 45—93.

*Shpakov A., Pertseva M., Kuznetsova L., Plesneva S. 2005.* A novel, adenylyl cyclase, signaling mechanism of relaxin H2 action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1041 : 305—307.

*Sudo S., Kumagai J., Nishi S., Layfield S., Ferraro T., Bathgate R. A. 2003.* H3 relaxin is a specific ligand for LGR7 and activates the receptor by interacting with both the ectodomain and the exoloop 2. *J. Biol. Chem.* 278 : 7855—7862.

*Szkudlinski M. W., Fremont V., Ronin C., Weintraub B. D. 2002.* Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol. Rev.* 82 : 473—502.

*Tanaka K., Nagayama Y., Nishihara E., Namba H., Yamashita S., Niwa M. 1998.* Palmitoylation of human thyrotropin receptor: slower intracellular trafficking of the palmitoylation-defective mutant. *Endocrinology.* 139 : 803—806.

*Tensen C. P., van Kesteren E. R., Planta R. J., Cox K. J. A., Burke J. F., van Heerikhuizen H., Vreugdenhil E. 1994.* A G protein-coupled receptor with low-density lipoprotein-binding motifs suggests a role for lipoproteins in G-linked signal transduction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 4816—4820.

*Timossi C., Maldonado D., Vizcaino A., Lindau-Shepard B., Conn P. M., Ulloa-Aguirre A. 2002.* Structural determinants in the second intracellular loop of the human follicle-stimulating hormone receptor are involved in G<sub>s</sub> protein activation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 189 : 157—168.

*Timossi C., Ortiz-Maldonado C., Pineda D. B., Dias J. A., Conn P. M., Ulloa-Aguirre A. 2004.* A functional significance of the BBXXB motif reversed present in the cytoplasmic domains of the human follicle-stimulating hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 223 : 17—26.

*Ulloa-Aguirre A., Conn P. M. 1998.* G protein-coupled receptors and the G protein family. In: *Conn P. M. (Ed.). Handbook of physiology-endocrinology. Section 7. Cellular Endocrinology.* New York: Oxford Univ. Press. 87—124.

*Ulloa-Aguirre A., Janovick J. A., Brothers S. P., Conn P. M. 2004.* Pharmacological rescue of conformationally-defective proteins: implications for the treatment of human disease. *Traffic.* 5 : 821—837.

*Ulloa-Aguirre A., Uribe A., Zarinan T., Bustos-Jaimes I., Perez-Solis M. A., Dias J. A. 2007.* Role of the intracellular domains of the human FSH receptor in G<sub>α<sub>s</sub></sub> protein coupling and receptor expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260 : 153—162.

*Van Koppen C. J., Zaman G. J. R., Timmers C. M., Kelder J., Mosselman S., Van de Lagemaat R., Smit M. J., Hanssen R. G. J. M. 2008.* A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 378 : 503—514.

*Vassart G., Pardo L., Costagliola S. 2004.* A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem. Sci.* 29 : 119—126.

*Vlaeminck V., Ho S. C., Rodien P., Vassart G., Costagliola S. 2002.* Activation of the cAMP pathway by the TSH receptor involves switching of the ectodomain from a tethered inverse agonist to an agonist. *Mol. Endocrinol.* 16 : 736—746.

*Yi C. S., Song S., Ryu K. S., Ji I., Ji T. H. 2002.* Common and differential mechanisms of gonadotropin receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 59 : 932—940.

*Zaballos M. A., Garcia B., Santisteban P. 2008.* Gβγ dimers released in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells. *Mol. Endocrinol.* 22 : 1183—1199.

*Zhang M., Mizrahi D., Fanelli F., Segaloff D. L. 2005.* The formation of a salt bridge between helices 3 and 6 is responsible for the constitutive activating and lack of hormone responsiveness of the naturally occurring L457R mutation of the human lutropin receptor. *J. Biol. Chem.* 280 : 26 169—26 176.

*Zhang M., Tong K. P., Fremont V., Chen J., Narayan P., Puett D., Weintraub B. D., Szkudlinski M. W. 2000.* The extracellular domain suppresses constitutive activity of the transmembrane domain of the human TSH receptor: implications for hormone-receptor interaction and antagonist design. *Endocrinology.* 141 : 3514—3517.

---

STRUCTURAL-FUNCTIONAL ORGANIZATION OF POLYPEPTIDE HORMONES RECEPTORS  
CONTAINING LRR-REPEATS AND THEIR INTERACTION WITH HETEROTRIMERIC G PROTEINS

*A. O. Shpakov*

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;  
e-mail: alex\_shpakov@list.ru

The data on structural-functional organization of the serpentine type receptors containing LRR-repeats termed LGR receptors were summarized and analyzed. These receptors include the receptors of pituitary glycoprotein hormones (gonadotropins and thyrotropin) and the relaxin receptors RXFP1 and RXFP2. The mechanisms of the activation of the receptors by the hormones, and molecular basis of interaction between the receptors and heterotrimeric G proteins were considered. The role of membrane-proximal regions of cytoplasmic loops of the receptors and adjacent segments of transmembrane regions in the formation of G protein-binding surface of the receptor and in the activation of the G proteins are discussed. On the basis of literature data and our results, the molecular determinants responsible for selectivity and efficiency of interactions with the G proteins were detected in the LGR-receptors.

**Key words:** adenylyl cyclase, heterotrimeric G protein, luteinizing hormone, relaxin, thyrotropin, follicle-stimulating hormone, phosphoinositides, cytoplasmic loop, LGR-receptor.

---